第44卷 第4期
2001年11月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44，No.4
Nov.，2001

基于16s rRNA序列的新蚤属二齿新蚤种团部分种类的分子系统发育关系

鲁 亮，吴厚永
（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100071）

摘要：通过比较线粒体基因组16s rRNA基因片段的差异，研究了分布于我国的二齿新蚤种团（*bidentatiformis* group）7种新蚤的分子系统发育关系，以斯氏新蚤种团的特新蚤作为外群。结果显示，其中5个种（*Neopsylla bidentatiformis*、*N. mana*、*N. pleski*、*N. teratura* 和 *N. hongyangensis*）的种间序列差异小于1%，变异水平和种内变异相当，显示了它们之间较近的亲缘关系；*N. abagaitui* 和上述5种之间有约4%的变异，说明该种有较长的分化历史。来自两个地区的二齿新蚤4个样本间有两种不同的基因型，而红羊新蚤可以归入其中的一种。加上形态特征的特点，可以认为红羊新蚤不应该属于毛新蚤种团，而属于二齿新蚤种团；至于其是否为二齿新蚤的同种异名，还有必要做进一步的研究。另外，*N. siboi* 和形态近缘种 *N. teratura* 之间存在20%的变异，其原因有待进一步研究。

关键词：新蚤属；二齿新蚤种团；16s rRNA；分子系统发育关系
中图分类号：Q969 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2001）04-0548-07

新蚤属 *Neopsylla* 二齿新蚤种团（*bidentatiformis* group）在我国主要分布于古北界，其中的许多种类曾被分离到鼠疫菌，所以该种团具有较高的医学重要性。该种团的种类较多，而且形态上又非常接近，近来在我国命名的两个新种就体现了这种现象。

李贵真等[1,2]1986年命名的红羊新蚤 *N. hongyangensis* Li，Bai *et* Chen，1986和二齿新蚤 *N. bidentatiformis*（Wagner，1893）在形态上非常接近，但根据其第9腹板肘部腹面有一向后方伸出的瓶形腹小臂，被认为和毛新蚤种团（*setosa* group）的种类有较近的亲缘关系。后来发现在甘肃、青海等地许多被鉴定为二齿新蚤的标本实际上为红羊新蚤[3]。因此《青藏高原蚤目志》中认为该地区只有红羊新蚤，而没有二齿新蚤，并将其列入毛新蚤种团[4]。但是我们通过检视从吉林和北京采集的二齿新蚤标本中有一些个体也具有较小的瓶形腹小臂，从而对红羊新蚤种的地位是否成立提出了疑问。

1993年命名的思博新蚤 *N. siboi* Ye *et* Yu，1993的成虫和幼虫在形态上则和曲棘新蚤 *N. teratura* Rothschild，1913非常接近[5]。叶瑞玉等[6~8]通过近代新蚤东方亚种 *N. pleskei orientalis*、曲棘新蚤和思博新蚤三者间的人工杂交显示，这三种新蚤间能够产生可育的后代，于是认为这三种新蚤种的地位值得商榷。鲁亮等[9]利用PAPD技术对上述三种新蚤实验种群的DNA多态关系进行了研究，结果发现形态上关系很近的思博新蚤和曲棘新蚤并不显示较近的DNA

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30070679）；军事医学科学院院创新基金项目
收稿日期：2000-08-19；接受日期：2001-02-07

多态关系，形成了分子关系和形态关系间的矛盾。

传统的昆虫分类和系统发育关系研究主要根据外部形态特征，在这个过程中难免受到各种主观因素的影响，而且对于一些近缘种或隐种，传统的分类方法有时就可能无能为力，更难以深入进行系统发育关系研究。近 20 年来不断发展的分子生物学技术为分类学和系统学带来了新的方法，并解决了许多重要的分类问题。线粒体基因组由于特殊的遗传方式，成为一种常用的研究系统发育关系的对象。本研究中我们利用线粒体基因组的 16s rRNA 基因研究分布于我国的二齿新蚤种团主要种类的分子系统发育关系，为探索该种团内各个种的系统发育关系提供一个方面的资料。

1　材料和方法

1.1　标本来源

本研究所用标本材料见表 1，其中特新蚤属于斯氏新蚤种团（*stevensi* group），作为外群，所有标本都用 95%的乙醇浸泡并冷冻保存。除特新蚤采用 1 个样本外，二齿新蚤两个地方种群和其余各种均采用 2 个样本，详见表 1。

表 1　本研究所用新蚤标本来源及个体代码

Table 1　*Neopsylla* species used in this study and their hosts，localities and individual code

种类 Taxon	宿主 Host	采集地 Locality	个体代码 Individual code
二齿新蚤	大仓鼠	北京	NbBJ1
N. bidentatiformis	*Cricetulus triton*	Beijing	NbBJ2
二齿新蚤	达乌尔黄鼠	内蒙古赤峰	NbNM1
N. bidentatiformis	*Citellus dauricus*	Chifeng，Nei Mongol	NbNM2
阿巴盖新蚤	达乌尔黄鼠	内蒙古赤峰	NaNM1
N. abagaitui	*Citellus dauricus*	Chifeng，Nei Mongol	NaNM2
宽新蚤	不详	新疆	NmXJ1
N. mana	unknown	Xinjiang	NmXJ2
近代新蚤	不详	新疆	NpXJ1
N. pleski	unknown	Xinjiang	NpXJ2
思博新蚤	不详	新疆	NsXJ1
N. siboi	unknown	Xinjiang	NsXJ2
曲棘新蚤	不详	新疆	NtXJ1
N. teratura	unknown	Xinjiang	NtXJ2
红羊新蚤	长尾仓鼠	青海祁连	NhQH1
N. hongyangensis	*Cricetulus longicaudatus*	Qilian，Qinghai	NhQH2
特新蚤	大仓鼠	北京	NspBJ
N. specialis	*Cricetulus triton*	Beijing	

1.2　DNA 提取和标本鉴定

提取 DNA 前，将乙醇保存的标本置于 4℃的 Tris-EDTA 缓冲液中洗去乙醇。然后将标本切成三段，用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA，剩余的几丁质部分再用 10%的 KOH 溶液在室温

下腐蚀适当时间后制成玻片标本进行鉴定。蚤种的鉴定参考《中国动物志·昆虫纲·蚤目》[10]和其它相关的文献资料。

1.3　PCR 扩增和测序

按常规 PCR 方法进行扩增。所用引物为 TL2-J-3037（5′-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3′）和 A8-N-3914（5′-TCATCTTATAGGTACTATTTGAGG-3′）[11]。扩增产物通过 pGEM-T Vector System Ⅰ（PROMEGA）连接到 pGEM-T 载体中。连接产物通过一步法转入大肠杆菌 *E. coli* XL-1 菌株，通过蓝白斑法筛选阳性克隆进行测序。测序试剂为 ABI PRISM BigDye 试剂盒及 Ampli Taq DNA 聚合酶（PERKIN ELMER）。测序仪为 ABI 377（PERKIN ELMER）。

1.4　序列分析和系统树构建

所得序列首先用 CLUSTAL W 软件[12]排列成等长的矩阵，必要时进行手工调整。所得的序列矩阵转换成 PHYLIP 格式后用 PHYLIP 软件包[13]计算获得关系树。用 DNAPARS 程序获得了基于 Wagner 简约法的系统发育关系树；用 DNADIST 程序根据Kimura's 2-parameter 模型计算个体间遗传距离，在 NEIGHBOR 程序中用 Neighbor-joining 法获得关系树。两种计算过程中都进行了 500 次的自导复制（bootstrip），最后在 CONSENSE 程序中形成合意树。同时参考果蝇 *Drosophila yakuba* 的 16s rRNA 二级结构[14]确定所得 16s rRNA 片段中的“杆”和“泡”结构。在此基础上确定不同结构区的碱基替换模式。

所有序列均在 Genbank 中注册，注册号为：AF269109 ~ AF269125。

表 2　本研究包括种类（思博新蚤除外）个体间 16s rRNA 的变异位点

Table 2　The mutation sites in 16s rRNA of individuals of seven species except *N. siboi* compared with NbBJ2

个体代码 Individual code	变异位点序号及其变异* Number of mutation site and mutations in individuals																																															
	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5
	3	3	5	6	6	6	6	3	5	7	9	1	1	1	2	5	5	6	6	7	7	7	8	9	9	9	9	9	0	2	3	4	4	4	5	5	6	6	7	7	8	9	4	8	8	3	3	3
	0	8	9	3	4	5	8	6	1	6	8	6	8	9	3	5	8	4	9	0	1	8	4	0	1	6	7	8	0	9	3	7	8	9	0	1	8	9	0	2	3	8	2	7	8	3	4	7
NbBJ2	T	A	G	A	-	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	A	G	G	G	A	T	A	T	T	T	A	G	-	T	A	-	-	A	T	T	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	C
NbBJ1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
NbNM2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NmXJ1	.	.	A	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NmXJ2	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NpXJ2	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NpXJ1	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NtXJ1	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NtXJ2	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NhQH2	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	-	.	.	T	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	G
NhQH1	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	-	.	.	T	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	G
NbNM2	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	-	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	T	.
NaNM1	.	T	.	.	T	.	.	.	.	G	.	.	A	G	A	.	G	.	T	.	T	A	.	C	A	-	.	A	T	.	G	.	.	.	A	A	.	T	T	A	.	G	.	G	.	T	.	.
NaNM2	.	T	.	.	T	.	.	.	.	G	.	.	A	G	A	.	G	.	T	.	T	A	.	C	A	-	.	A	T	.	G	A	.	.	A	A	.	T	T	A	.	G	.	.	.	T	.	.
NspBJ	A	.	.	T	T	T	-	G	A	.	G	A	G	A	A	G	.	A	A	T	T	.	T	.	.	-	.	A	T	.	G	A	T	T	.	.	G	G	T	A	T	.	.	.	.	.	.	.

* 纵列的 3 个数字表示变异位点，字母为碱基；“-”表示缺失；“.”表示相同

Three numbers in vertical line means the number of mutation site, letter means the base of the site; “-” means deletion; “.” means similarity

表 3　思博新蚤 16s rRNA 变异位点

Table 3　The mutation sites in 16s rRNA of individuals of *N*. *siboi* compared with NbBJ2

个体代码 Individual code	变异位点序号及其变异* Number of mutation site and mutations in individuals
	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
	3 3 3 3 3 4 4 5 6 6 7 8 9 9 1 1 1 2 2 2 3 3 4 5 6 7 7 7 7 8 8 9 9 0 0 1 1 1 1 2 4 4 4 5 5 5 5 5 5 5 6 6 6 6 6
	0 1 3 4 8 8 9 7 3 8 4 1 2 7 3 8 9 3 4 8 2 9 6 5 1 1 3 4 9 0 8 1 8 0 9 1 6 8 9 3 0 3 5 2 4 5 6 7 8 9 1 4 3 5 6
NbBJ2	T T A T A A T T A A A G C A A T T - - A A A A A G A A T G T A A A G C T T T T G T A G A A A A A A T A G G T A
NsXJ1	A A T A T C C C T - G A T G C - - T T G G T G G T T T A T A T T T A T A A A A A A G T T T T G T T A T T A A T
NsXJ2	A A T A T . C C T - G A T G C - - T T G G T G G T T T A T A T T T A T A A A A A A G T T T T G T T A T T A A T
	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 5 5 5 5 5
	6 7 7 7 7 7 8 8 8 8 9 9 0 0 0 1 2 2 3 4 4 4 4 4 4 5 6 6 7 7 7 8 8 8 8 8 9 9 9 0 1 2 2 3 4 4 4 4 8 8 1 1 1 2 3
	9 0 2 3 5 6 0 2 3 6 2 8 0 2 4 7 2 3 2 2 3 4 5 7 8 4 3 5 0 2 3 1 2 3 6 7 4 7 8 8 1 8 9 6 1 2 4 5 5 7 1 2 5 9 2
NbBJ2	G G T T A T A T T A - G - T T C G G T T T T T - - A T T A G T T A A T G T G A - A T A G A A T A - A A A T A -
NsXJ1	T A A A G A T A A T A A A A A T T T A A A A A T T - A - T A A G T T A T A A T C - C T T T T A T G T G T A T G
NsXJ2	T A A A G A T A A T A A A A A T T T A A A A A T T - A - T A A G T T A T A A T C - . T T T T A T G T G T A T G

*纵列的 3 个数字表示变异位点，字母为碱基；“-”表示缺示；“.”表示相同

Three numbers in vertical line means the number of mutation site，letter means the base of the site；“-” means deletion；“.” means similarity

2　结果

除特新蚤以外，二齿新蚤的两个地方种群及其它各个种都研究了两个个体的序列。所得序列长度在 552～555 个碱基之间。GC 含量都在 26%左右。通过 CLUSTAL 软件排列以后发现，在这些序列中变异主要集中在思博新蚤，与 NbBJ2 个体相比，共有 110 个变异位点，变异率达 20%。其次才是作为外群的特新蚤，共有 31 个变异位点，变异率为 6%。阿巴盖新蚤有 24 个变异位点，变异率为 4%。另外，宽新蚤、近代新蚤和 1 个曲棘新蚤个体的序列完全一致，另一个曲棘新蚤个体则有 1 个变异位点。它们与 NbBJ2 有 3 个变异位点，和二齿新蚤个体间的差异接近。除此以外的二齿新蚤和红羊新蚤则可以根据变异位点分成 2 个类群，类群 1 包括二齿新蚤个体 NbBJ2、NbBJ2 和 NbNM2，类群 2 包括二齿新蚤个体 NbNM1 和 2 个红羊新蚤个体（表 2、表 3）。

由于与果蝇的 16s rRNA 基因序列有较大的差异，只能得出大致的二级结构。根据这样的二级结构分析，种内和种间的变异主要发生在“泡”的区域，种内主要以转换为主，种间则以颠换为主（占 66%）。在所有的变异位点中，AT 颠换有 80 次，AG 转换有 40 次，其它颠换有 27 次，这些变异主要发生在阿巴盖新蚤、特新蚤和思博新蚤三个种内。

根据不同的关系树计算方法，获得了两棵关系树（图 1）。两棵对显示的种内和种间关系基本一致。曲棘新蚤、宽新蚤和近代新蚤由于变异很小，被归为一个类群；二齿新蚤个体 NbBJ1、NbBJ2 和 NbNM2 被归为一类；二齿新蚤个体 NbNM1 和红羊新蚤被归为一类。阿巴盖新蚤比较独立地形成一个类群。思博新蚤由于变异大于作为外群的特新蚤，所以被置于关系树的最外围。由于有些个体间变异较小，有的甚至完全一致，两棵关系树中这些个体形成的节点在自导复制中所占的比例较低，但这并不影响它们之间的关系。

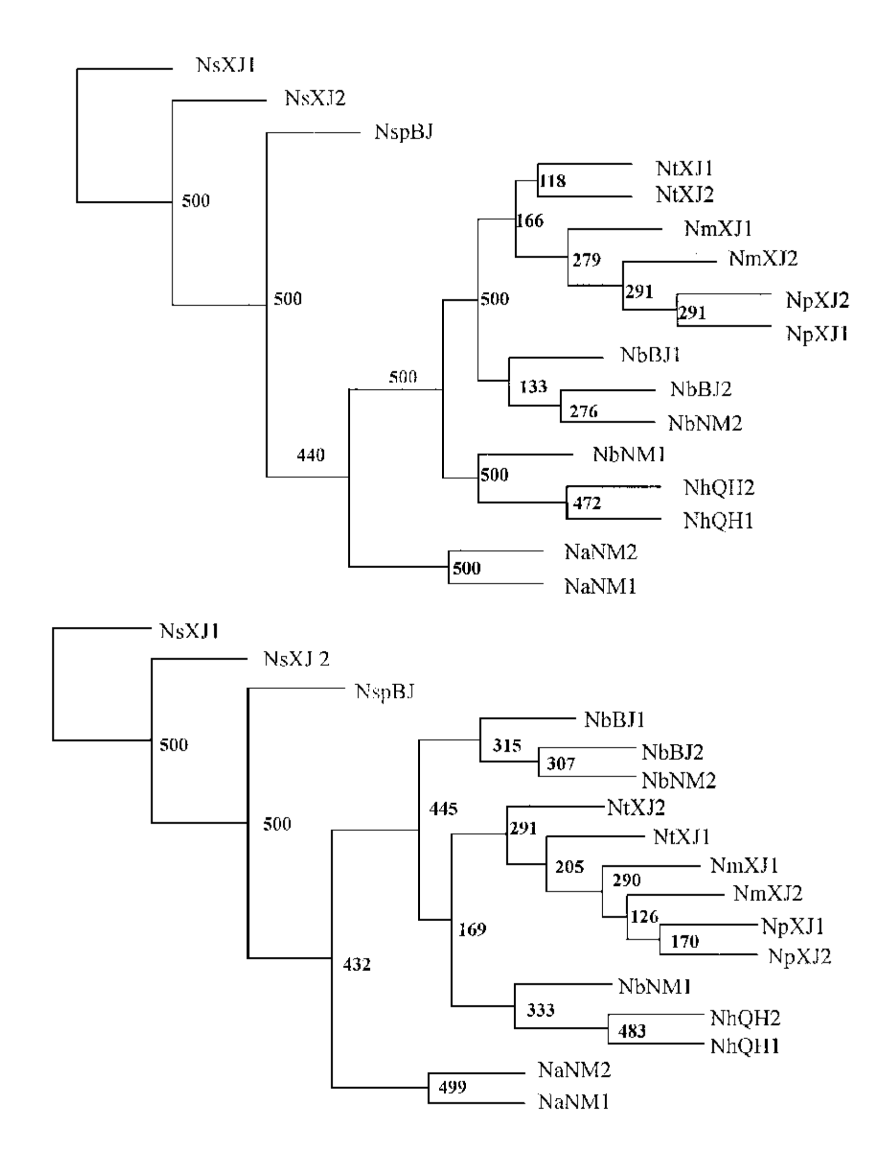


图1 根据不同计算方法得出的两棵系统发育关系树

Fig. 1 Two phylogeny trees based on different methods

A: Neighbor-jiont 树 Neighbor-jiont tree; B: Wagner 简约树 Wagner parsimony tree;

节点处数字为500次自导复制中该节点存在的次数

The number at the node is the number of times of this node appears in bootripes

3 讨论

所研究的8种蚤的16s rRNA的GC含量基本一致，在Simon等[11]报告的范围之内。在这些种16s rRAN的变异过程中，个体间有较多AG转换，随着变异的增加，AT颠换成为变异的主要方式，这也和其它的同类研究结果相一致。

从现有的数据分析，被大量运用于其它昆虫种间系统研究的 16s rRNA 在 8 种蚤中的曲棘新蚤、宽新蚤、近代新蚤、二齿新蚤和红羊新蚤间没有呈现种间的分子差异，说明这几种蚤间的分子系统发育关系要比形态学上理解的关系更近，似乎更接近种群间的系统发育关系。这种现象在 Tang 等[15]研究的恶蚋 *Simulium damnosum* 复合组中也曾出现。或许在研究种团和复合组水平的种关系时选择其它一些蛋白编码基因更可能说明问题。

红羊新蚤和二齿新蚤形态上的主要区别是其第 9 腹板肘部的瓶形腹小臂。我们通过检视大量的二齿新蚤标本，发现分布于北京、吉林等地的二齿新蚤标本中有一部分具有明显的瓶形腹小臂状结构，虽然个体数量较少，结构不如红羊新蚤的典型，但可以说明这个结构是种内的形态变异。从 16s rRNA 的结果分析，来自北京和内蒙古的二齿新蚤和红羊新蚤可以分为两组，它们之间最大序列差异小于 1%，说明这两组属于种内的两个多态类型。因此将红羊新蚤置于毛新蚤种团是不合适的。我们可以假设瓶形腹小臂的结构有可能是一种基因型决定的，这种基因型在青海、宁夏等地相当普遍，造成瓶形腹小臂特征的普遍性；而在北京、吉林等地这种基因型的比例很低。如果这个假设成立，则红羊新蚤可能是二齿新蚤的同种异名。

曲棘新蚤、宽新蚤、近代新蚤和二齿新蚤之间有着稳定的形态差异和生态差异，它们之间种的地位应该是稳定的，从 16s rRNA 这一个分子的结果的相似性还不能否定它们形态种的地位。

对于思博新蚤和其它新蚤的关系，本研究的结果与鲁亮等[9]运用 RAPD 的研究结果有一致之处：形态上和曲棘新蚤接近的思博新蚤在 16s rRNA 序列上有相当大的变异，以至于在关系树中将它置于特新蚤之外。这种形态关系和分子关系之间的分歧现象，在其它昆虫的分子系统发育关系研究中也有[16]，但并不多见，其原因还有待于进一步的研究。

致谢 本单位的郭天宇同志帮助采集二齿新蚤北京种群和特新蚤的标本，赤峰市卫生防疫站的石杲同志提供二齿新蚤内蒙古种群和阿巴盖新蚤的标本，青海省地方病防治研究所的李超同志提供红羊新蚤的标本，新疆地方病防治研究所的钱存宁研究员提供了宽新蚤和近代新蚤东方亚种的标本，新疆地方病防治研究所的于心和叶瑞玉研究员提供了曲棘新蚤和思博新蚤的标本。在此向他们表示衷心的感谢。

参 考 文 献 (References)

[1] 李贵真，白学礼，陈白芳．宁夏新蚤属一新种记述．四川动物，1986，5（2）：1～3
[2] 李贵真，吴文贞，张荣广．红羊新蚤的地理分布、宿主关系和鉴别特征的研究．昆虫学报，1995，38（2）：161～165
[3] 肖柏林．红羊新蚤的幼虫形态及与二齿新蚤幼虫的比较．昆虫学报，1993，36（1）：67～70
[4] 蔡理芸等编著．青藏高原蚤目志．西安：陕西科学技术出版社，1997．66～67
[5] 叶瑞玉，于 心．新蚤属一新种及其幼虫形态的记述．昆虫学报，1993，36（3）：371～374
[6] 叶瑞玉，张金桐，张自建等．蚤类的种间杂交及其分类学意义（一）曲棘新蚤×思博新蚤．寄生虫与医学昆虫学报，1997，4（3）：164～169
[7] 叶瑞玉，张金桐，张自建等．蚤类的种间杂交及其分类学意义（二）思博新蚤×近代新蚤．寄生虫与医学昆虫学报，1997，4（4）：218～222
[8] 叶瑞玉，张自建，热孜万等．蚤类种间杂交及其分类学意义（三）近代新蚤×曲棘新蚤．寄生虫与医学昆虫学报，

1998，5（1）：49～53

［9］ 鲁 亮，张金桐，吴厚永．三种新蚤 RAPD 关系的初步研究．寄生虫与医学昆虫学报，1999，6（4）：234～238

［10］ 柳支英等编著．中国动物志•昆虫纲•蚤目．北京：科学出版社，1986．327～417

［11］ Simon C，Frati F，Beckenbach A *et al*. Evolution，weighting，and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a comilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am.，1994，87（6）：651～701

［12］ Thompson J D，Higgins D G，Gibson T J. CLUSTAL W：improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting，position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic. Acids Res.，1994，22（22）：4 673～4 680

［13］ Felsenstein J. PHYLIP（Phylogeny Inference Package）. Version 3.5c. University of Washington. Seattle，1993

［14］ Clary D O，Wolstenholme D R. The ribosomal RNA gense of *Drosophila* mitochondrial DNA. Nucleic. Acids Res.，1985，13（11）：4 029～4 045

［15］ Tang J，Toe L，Back C *et al*. The *Simulium damnosum* species complex phylogenetic analysis and molecular identification based upon mitochondrially encoded gene sequences. Insect Mol. Biol.，1995，4（2）：79～88

［16］ Miller B R，Crabtree M B，Savage H M. Phylogenetic relationships of the *Culicomorpha* inferred from 18s and 5.8s ribosomal DNA sequences（Diptera：Nematocera）. Insect Mol. Biol.，1997，6（2）：105～114

The molecular phylogeny of some species of the *bidentatiformis* group of the genus *Neopsylla* based on 16s rRNA gene

LU Liang，WU Hou-yong

（Institute of Microbiology and Epidemiology，Beijing 100071，China）

Abstract: The molecular phylogeny of seven species of the *bidentatiformis* group in the genus *Neopsylla* was studied based on the mutation of 16s rRNA gene in mitochondrial genome. The results showed that the interspecies mutation rate of five species（*N. bidentatiformis*，*N. mana*，*N. pleski*，*N. teratura* and *N. hongyangensis*）was 1%，the same as the intraspecies mutation，suggesting that the relations among these species are closer; while the mutation rate of *N. abagatui* is 4%，suggesting the long diversity history of *N. abagatui*. Four samples of *N. bidentatiformis* from two localities showed two genotypes，one of which was also found in *N. hongyangensis*. As suggested also by the morphological character，*N. hongyangensis* should not be classified to the setosa group. Whether *N. hongyangensis* and *N. bidentatiformis* are the same species needs further study. *N. siboi* showed unexpected large mutation rate（20%）compared with morphologically related species *N. teratura*，and the reason for this is not clear.

Key words: *Neopsylla*; *bidentatiformis* group; 16s rRNA; molecular phylogeny